

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Josipa Fako**

**ODREĐIVANJE SADRŽAJA ŽELJEZA U RAZLIČITIM TIPOVIMA BRAŠNA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2016.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane  
Katedra za prehranu  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

### Diplomski sveučilišni studij Znanost o hrani i nutricionizam

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Nutricionizam

**Nastavni predmet:** Dijetoterapija

**Tema rada** je prihvaćena na XI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016. održanoj 28. rujna 2015.

**Mentor:** doc. dr. sc. *Ines Banjari*

### Određivanje sadržaja željeza u različitim tipovima brašna

*Josipa Fako, 261-DI*

#### Sažetak:

Hrana koja predstavlja osnovu svakodnevne prehrane, hrana biljnog podrijetla sadrži željezo niske bioraspoloživosti, pa se sve veći naglasak stavlja na potencijal funkcionalne hrane u prevenciji ovog najčešćeg prehrambenog deficita u svim zemljama svijeta. Određen je sadržaj željeza heljadinog, pirovog, prosenog, raženog, slanukovog, sojinog i zobenog brašna primjenom brze spektrofotometrijske metode koju su razvili Kosse i sur. (2001.). Validacija metode pokazuje dobru linearnost i ponovljivost pripreme otopina (relativna standardna devijacija se kreće od 1,07 do 2,81 %), ali ne pokazuje dobru točnost, a mogući je razlog visok sadržaj fitinske kiseline u ispitivanim uzorcima. Sojino brašno je imalo najveći (8,83 mg/100 g) a heljdino brašno najniži sadržaj željeza (2,16 mg/100 g). Obzirom na prosječnu konzumaciju kruha i peciva na razini Hrvatske i pojedinim regijama prema podacima Hrvatske agencije za hranu, najveći procijenjeni potencijalni unos željeza je u regiji Lika i Banovina, a slijede Slavonija, Istra, Primorje i Gorski Kotar, Sjeverna Hrvatska, Dalmacija, te Grad Zagreb. Analizirani tipovi brašna se obzirom na sadržaj željeza mogu smatrati funkcionalnim proizvodima koji bi se trebali preporučivati svim osobama u riziku od nedovoljnog unosa željeza prehranom. Treba imati u vidu visok sadržaj fitinske kiseline koja može značajno negativno utjecati na bioraspoloživost željeza, pa se ističe potreba edukacije o pravilnom kombiniranju hrane.

**Ključne riječi:** željezo, brašno, spektrofotometrijska metoda, validacija, kruh i pekarski proizvodi

**Rad sadrži:** 46 stranica  
5 slika  
5 tablica  
0 priloga  
42 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	doc. dr. sc. <i>Ivana Flanjak</i>	predsjednik
2.	doc. dr. sc. <i>Ines Banjari</i>	član-mentor
3.	prof. dr. sc. <i>Daniela Čačić Kenjeric</i>	član
4.	izv. prof. dr. sc. <i>Daliborka Koceva Komlenić</i>	zamjena člana

**Datum obrane:** 07. rujna 2016.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Food and Nutrition Research  
Subdepartment of Nutrition  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food science and nutrition

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Nutrition

**Course title:** Diet therapy

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. XI held on September 28, 2015.

**Mentor:** *Ines Banjari*, PhD, prof.

### Determination of iron content in different types of flours

*Josipa Fako*, 261-DI

### Summary:

Food that represents the basis of a daily diet, plant food contains iron of low bioavailability. Therefore, the emphasis is put on the potential of functional foods in the prevention of the most common nutritional deficiency around the globe. Iron content of buckwheat, spelt, millet, rye, chick pea, soy, and oat flour was determined by a spectrophotometric method developed by Kosse et al. (2001.). Validation showed good linearity and repeatability of sample preparation (relative standard deviation ranges from 1.07 to 2.81 %), up to 10 % difference), while recovery was unsatisfying possibly due to high phytic acid content in the test samples. Soy flour had the highest (8.83 mg/100 g), while buckwheat flour had the lowest iron content (2.16 mg/100 g). Considering the average consumption of bread and bakery products in Croatia and separate regions according to the Croatian Food Agency data, the highest estimated potential intake of iron is in region Lika and Banovina, followed by Slavonia, Istria, Pimorje and Gorski Kotar, Northern Croatia, Dalmatia and the City of Zagreb. Analysed types of flour can be considered as functional products that should be recommended to all people at risk of iron deficiency. High content of phytic acid needs to be considered since it can significantly negatively affect iron bioavailability, which emphasizes the need of education on proper food combinations.

**Key words:** iron, flour, spectrophotometric method, validation, bread and bakery products

**Thesis contains:** 46 pages  
5 figures  
5 tables  
0 supplements  
42 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, assistant prof.             | chair person |
| 2. <i>Ines Banjari</i> , PhD, assistant prof.              | supervisor   |
| 3. <i>Daniela Čačić Kenjeric</i> , PhD, full prof.         | member       |
| 4. <i>Daliborka Koceva Komlenić</i> , PhD, associate prof. | stand-in     |

**Defense date:** September 7, 2016.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Ines Banjari na ukazanom povjerenju te vremenu i trudu koje je uložila za izradu ovog diplomskog rada i za savjete tijekom cijelog studiranja.

Najviše se zahvaljujem svojoj obitelji na potpori, razumijevanju i vjerovanju u mene.

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. ULOGA ŽELJEZA U ORGANIZMU .....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Metabolizam željeza .....	5
2.1.2. Deficit željeza.....	5
2.1.3. Epidemiološki podaci .....	6
<b>2.2. ŽELJEZO U HRANI .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3. BIORASPOLOŽIVOST ŽELJEZA.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4. PRINCIPI PRAVILNE PREHRANE .....</b>	<b>10</b>
<b>2.5. ŽITARICE I LEGUMINOZE .....</b>	<b>11</b>
<b>2.6. VALIDACIJA .....</b>	<b>15</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. ZADATAK .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>20</b>
3.2.1. Validacija spektrofotometrijske metode određivanja željeza .....	20
3.2.2. Spektrofotometrijska metoda određivanja željeza.....	21
3.2.3. Procjena potencijalnog unosa željeza iz kruha i pekarskih proizvoda na razini Hrvatske .....	23
3.2.4. Obrada podataka .....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. VALIDACIJA SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE ODREĐIVANJA ŽELJEZA .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2. ODREĐIVANJE KOLIČINE ŽELJEZA.....</b>	<b>30</b>
<b>4.3. PROCJENA POTENCIJALNOG UNOS ŽELJEZA IZ KRUHA I PEKARSKIH PROIZVODA....</b>	<b>34</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>39</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>41</b>

## **Popis oznaka, kratica i simbola**

DNK	Deoksiribonukleinska kiselina
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane
HAH	Hrvatska agencija za hranu
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija

## **1. UVOD**

Najčešći prehrambeni deficit danas je upravo deficit željeza i posljedično anemija uslijed deficita željeza (tzv. sideropenija) (WHO, 2016.; Banjari, 2013.). Populacijske skupine koje su posebice izložene riziku deficita željeza uključuju djecu, žene reproduktivne dobi i trudnice (WHO, 2001.; Banjari, 2012.).

Prehrambeni unos željeza je pod utjecajem brojnih čimbenika koji djeluju na njegovu bioraspoloživost pozitivno (npr. meso i proizvodi, vitamin C) ili pak negativno (npr. fitati, kalcij, tein, kofein) (Banjari i sur., 2013.). Hrana koja predstavlja osnovu svakodnevne prehrane, hrana biljnog podrijetla sadrži željezo niske bioraspoloživosti (Banjari, 2012.). Upravo se iz tog razloga sve veći naglasak stavlja na mogućnosti prevencije deficita kroz različitu funkcionalnu hranu (Banjari, 2013.; WHO, 2001.).

Žitarice i njihovi proizvodi (kruh i peciva) se u Republici Hrvatskoj konzumiraju svakodnevno i u značajnim količinama, pa se upravo ova skupina hrane izdvaja kao potencijalno rješenje u povećanju dnevnog unosa željeza (Banjari, 2013.). U pekarstvu se koriste različite vrste brašna, koje su najčešće siromašne željezom (npr. bijelo i polubijelo pšenično brašno), no razvijen je cijeli niz formulacija kruha i peciva koji sadrže različite kombinacije brašna poput sojinog, heljadinog, raženog, prosovog, slanutkovog i drugih (Ugarčić-Hardi, 2007.). Ove žitarice i njihova brašna sadrže veće količine željeza (SND, 2016.; Kaić-Rak i Antonić, 1990.), pa se njihovim dodatkom u zamjes kruha i/ili peciva može povećati i ukupni sadržaj željeza u finalnom proizvodu. Osim toga, primjenjuje se i obogaćivanje brašna (npr. bijelog pšeničnog brašna) različitim preparatima željeza (Banjari, 2013.).

Cilj ovog diplomskog rada bio je validirati brzu spektrofotometrijsku metodu za određivanje sadržaja željeza (Kosse i sur., 2001.), te zatim odrediti sadržaj željeza u različitim tipovima brašna primjenom navedene metode. Osim toga, cilj je bio procijeniti unos željeza koji bi se postigao konzumacijom kruha i peciva napravljenih od analiziranih tipova brašna na razini Republike Hrvatske i pojedinačno u šest regija.

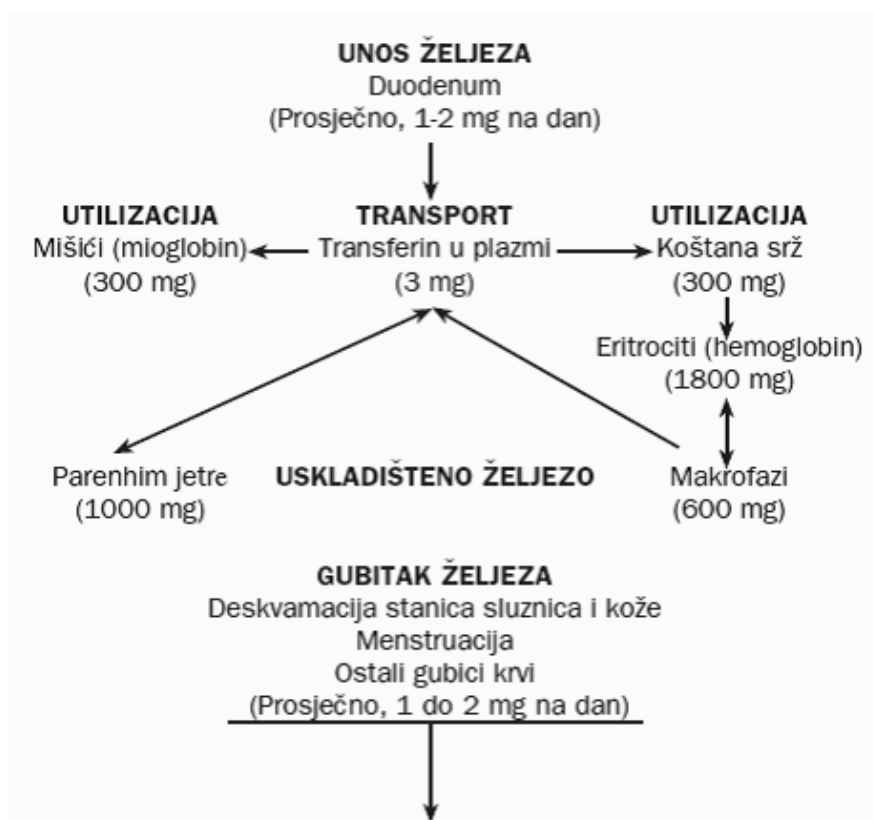


## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. ULOGA ŽELJEZA U ORGANIZMU

Željezo je ključni element u funkcioniranju svih stanica, iako količina željeza koja je potrebna pojedinim tkivima varira tijekom razvoja. U isto vrijeme, tijelo se mora štititi od viška slobodnog željeza, koje može sudjelovati u kemijskim reakcijama koje generiraju slobodne radikale. Neophodno je za mnogobrojne metaboličke procese, uključujući transport kisika, DNK sintezu i transport elektrona (Banjari, 2012.).

U ljudskom organizmu, željezo se nalazi u koncentraciji 30 – 40 mg/kg tjelesne mase (u obliku hemoglobina, mioglobina, transferina i feritina), no varira s dobi i spolom. Najveći sadržaj, 70 %, je u crvenim krvnim stanicama kao vitalan sastojak hemoglobina, a 5 % sastojak je mišićnog hemoglobina, mioglobina. U plazmi ima vrlo malo željeza, a ono je vezano na protein nosač,  $\beta$ -globulin, koji se zbog transportne uloge zove transferin. Oko 20 % željeza vezano je na protein feritin, a pohranjuje se u jetri, slezeni, sluznici crijeva i koštanoj srži. Ostalih 5 % rašireno je u svim stanicama u organizmu, u enzimnom sustavu koji je važan za proizvodnju energije (**Slika 1**) (Glavaš, 2009.).



**Slika 1** Distribucija željeza u organizmu (Banjari, 2012.)

### 2.1.1. Metabolizam željeza

Željezo se apsorbira u gornjem dijelu tankog crijeva, a njegova apsorpcija dijelom ovisi o njegovom izvoru u prehrani. Željezo u hrani se javlja u dva oblika, kao hemsko (meso, riba) i nehemsko željezo (hrana biljnog podrijetla) (Whitney i Rolfes, 2011.). Hemsko željezo se dobro apsorbira bez obzira na sastav hrane i kiselost želuca, a ostali oblici željeza trebaju se pretvoriti u fero-ione što ovisi o prisutnosti kiseline u želucu (Glavaš, 2009.).

Posebni proteini pomažu u apsorpciji željeza iz hrane. Feritin, protein koji skladišti željezo, hvata željezo iz hrane i skladišti ga u stanicama tankog crijeva. Kada je tijelu potrebno željezo, feritin oslobađa dio željeza transferinu, proteinu koji transportira željezo. Transportni protein transferin dostavlja željezo koštanoj srži i drugim tkivima. Koštana srž koristi veće količine za sintezu novih crvenih krvnih stanica, dok ostala tkiva koriste manje. Višak željeza se skladišti u feritin, primarno u jetri ali i u koštanoj srži te slezeni. Ako ga tijelo ne treba, izlučuje se kada se stanice tankog crijeva ljušte putem fecesa; stanice crijeva se obnavljaju svakih tri do pet dana. Zbog toga što privremeno skladište željezo, ove stanice kontroliraju apsorpciju željeza bilo oslobađanjem željeza, kada je dnevni unos nizak, odnosno odlaganjem kada unos premaši potrebe (Whitney i Rolfes, 2011.).

### 2.1.2. Deficit željeza

Širom svijeta, deficit željeza je najčešći među deficitima nutrijenata, s anemijom uslijed deficita željeza kojom je pogođeno više od 1,6 milijardi ljudi, većinom djeca predškolske dobi i trudnice (Whitney i Rolfes, 2011.).

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) (WHO, 2016.) anemija je stanje u kojem broj crvenih krvnih stanica ili njihova sposobnost prijenosa kisika je nedostatna da zadovolji fiziološke potrebe, što ovisi o dobi, spolu, pušenju te statusu trudnoće.

Anemija je rezultat dugotrajnog negativnog balansa željeza u organizmu. Anemija uslijed deficita željeza je stanje u kojem je anemija dokaz nedostatka željeza (Banjari, 2013.). Deficit željeza bez anemije je češći poremećaj i ukazuje na iscrpljene zalihe željeza u organizmu, koje su još dovoljne kako bi se održavala normalna razina hemoglobina (Banjari, 2012.).

Nedostatak željeza negativno utječe na:

- kognitivne performanse, ponašanje i rast dojenčadi, djece predškolske i školske dobi
- imunološki status i morbiditet od infekcija kod svih dobni skupina, i
- fizičku sposobnost i radni učinak kod adolescenata i odraslih osoba.

Anemija uslijed deficita željeza u trudnoći povećava perinatalne rizike za majku i novorođenče te ukupnu smrtnost dojenčadi (WHO, 2001.).

### 2.1.3. Epidemiološki podaci

Prevalencija nedostatka željeza uvelike varira i ovisi o dobi, spolu, fiziološkim, patološkim, okolišnim i socioekonomskim uvjetima (WHO, 2001.).

Dojenčad su obično rođena s dovoljnim zalihama željeza u jetri i hematopoetskim tkivima. Majčino mlijeko sadrži relativno malo željeza, ali se željezo iz majčinog mlijeka puno bolje apsorbira od onoga iz kravljeg mlijeka. Nedostatak željeza najčešće se razvija nakon šest mjeseci starosti i kod isključivo dojene djece (WHO, 2001.).

Osim žena u reproduktivnoj dobi, deficit željeza je najčešći u predškolskoj dobi te tijekom puberteta, stoga se mijenjaju i potrebe za unosom željeza (**Tablica 1**). Može se pojaviti u starosti kada se pogorša kvaliteta i kvantiteta prehrane. Djevojčice u adolescentnoj dobi često ne konzumiraju dovoljno željeza kako bi nadoknadile gubitke tijekom menstruacije. Kao rezultat toga, najveća prevalencija deficita željeza se često javlja kod žena tijekom adolescencije. Tijekom trudnoće znatne količine željeza pohranjene su u placenti i fetusu. To rezultira povećanom potrebom za željezom od oko 700 – 850 mg tijekom cijele trudnoće. Apsorpcija željeza povećana je za vrijeme trudnoće, kada menstruacija prestane. Trudnice i dalje ne apsorbiraju dovoljno dodatnog željeza, pa se povećava rizik od deficita željeza. Laktacija rezultira gubitkom željeza preko majčinog mlijeka, ali amenoreja tijekom laktacije kompenzira dio željeza koji se gubi kroz majčino mlijeko (WHO, 2001.).

### **Prevalencija anemije u trudnoći**

Incidencija anemije i u industrijaliziranim i zemljama u razvoju je osobito velika tijekom trudnoće i laktacije zbog povećane potrebe za željezom. Međutim, većina ovih žena je već anemična u vrijeme začeća, i procijenjena prevalencija anemije kod žena koje nisu trudne je 43 % u razvijenim zemljama te 12 % u bogatijim regijama. Deficit željeza i anemija uslijed deficita željeza se često javljaju u kasnijim stadijima trudnoće čak i kod žena koje ulaze u trudnoću s relativno adekvatnim zalihama željeza (Banjari i sur., 2015.). Prevalencija anemije i deficita željeza u trudnica s područja Hrvatske u prvom tromjesečju predstavlja blaži javnozdravstveni problem, koji krajem gestacije poprima razmjere velikog javnozdravstvenog problema (Banjari, 2013.).

Dobro je poznato da anemija u trudnoći uzrokovana deficitom željeza negativno utječe na ishod trudnoće. Posljedice uključuju nisku porođajnu masu novorođenčadi, prijevremeni porod, komplikacije tijekom poroda i veću stopu carskog reza. Rizik je veći što je hemoglobin niži posebno ako su deficit željeza i anemija uslijed deficita željeza bili prisutni u ranijim stadijima trudnoće (Banjari i sur., 2015.).

Banjari i sur. (2015.) potvrdili su veću učestalost deficita željeza nego anemije uslijed deficita željeza. Deficit željeza u Hrvatskoj je 3,8 puta češći u ranoj trudnoći što je više od prethodno procijenjeno od SZO. Značajnost toga leži u činjenici da su žene izložene većem riziku razvoja anemije uslijed deficita željeza u kasnijim stadijima trudnoće. Suplementacija tijekom trudnoće se uvelike preporučuje zbog povećanih potreba tijekom trudnoće koje teško mogu biti zadovoljene samo putem uobičajene prehrane, posebno otkad je dokazano da je unos željeza prehranom među trudnicama nizak i niske bioraspoloživosti (Banjari i sur., 2015.).

## 2.2. ŽELJEZO U HRANI

Željezo u namirnicama dolazi u dva oblika, kao hemsko i nehemsko željezo. Osnovna razlika ove dvije vrste željeza je u apsorpciji. Ukupna apsorpcija željeza je niska; svega se 10 – 20 % ukupno unesenog željeza apsorbira, no količina ukupno apsorbiranog željeza se povećava ukoliko je prisutan deficit željeza. Hemsko željezo iz namirnica animalnog podrijetla se bolje apsorbira (20 – 40 %), dok željezo koje prevladava u ljudskoj prehrani, nehemsko iz namirnica biljnog podrijetla ima slabiju apsorpciju (1 – 10 %) zbog velikog broja inhibitornih čimbenika koji djeluju na njegovu bioraspoloživost (Banjari, 2012.).

Prehrana bazirana na biljnim namirnicama uglavnom sadrži nehemsko željezo te je apsorpcija željeza iz takve prehrane često 5 – 10 % ukupno unesenog željeza. Stoga je konzumacija žitarica vrlo važna jer one čine važan dio svakodnevne prehrane i glavni su izvor inhibitora apsorpcije te predstavljaju izvor nehenskog željeza koji doprinosi ukupnom unosu. Osobe koje su sklone ovakvom načinu prehrane, kao što su vegetarijanci, izložene su još većem riziku deficita željeza (Banjari, 2012.; Banjari i sur., 2013.).

Apsorpcija nehenskog željeza ograničena je na duodenum. Nehemsko željezo može biti ili feri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ili fero ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Feri željezo teži stvaranju kompleksa soli s anionima i ne apsorbira se lako, a zahtijeva pH ispod 3. Za razliku od njega, fero željezo ne stvara komplekse tako lako i topljiv je i do pH 8 (Banjari, 2013.).

**Tablica 1** Preporučeni unos željeza (mg/dan) (IOM, 2002.)

DOB	MUŠKARCI	ŽENE	TRUDNOĆA
7 do 12 mjeseci	11	11	
1 do 3 godine	7	7	
4 do 8 godina	10	10	
9 do 13 godina	8	8	
14 do 18 godina	11	15	27
19 do 50 godina	8	18	27
51+ godina	8	8	

### **2.3. BIORASPOLOŽIVOST ŽELJEZA**

Različita hrana sadrži različite količine bioraspoloživog željeza koje se mogu lako apsorbirati u duodenumu. Namirnice biljnog podrijetla, koje su osnova svakodnevne prehrane imaju nizak sadržaj željeza i malu bioraspoloživost. Bioraspoloživost željeza je pod utjecajem čimbenika koji promoviraju odnosno inhibiraju njegovu apsorpciju. Od čimbenika koji promoviraju apsorpciju vjerojatno je najpoznatiji utjecaj askorbinske kiseline, proteina mesa i ribe. S druge strane, čimbenici koji smanjuju apsorpciju željeza su fitinska i oksalna kiselina, škrob (djeluje na sličan način kao i fitati), polifenoli odnosno tanini iz kave i čaja, fosfati i fosfo-proteini iz bjelanjka jajeta i mlijeka, kalcij i drugi minerali (npr. cink), crveno vino (Banjari, 2012.; Banjari i sur., 2013.).

Askorbinska kiselina sprječava formiranje slabo topljivih feri spojeva preko redukcije željeza, potičući tako njegovu apsorpciju. Iako i sama za sebe potiče apsorpciju željeza ima jači učinak u prisutnosti fitata ili polifenola (Banjari, 2012.).

Fitinska kiselina sadrži fosfatne skupine vezane na inozitol koje djeluju kao kelatori mineralnih tvari poput kalcija, željeza i cinka, smanjujući njihovu bioraspoloživost. Fitati su prirodno prisutni u velikom broju biljnih vrsta, čineći 1 – 5 % mase mnogih leguminoza i žitarica. Kako su žitarice i proizvodi od žitarica uvelike zastupljene u svakodnevnoj prehrani, fitinska kiselina predstavlja značajan inhibitorni čimbenik u smislu bioraspoloživosti mineralnih tvari. Pekarska je industrija razvila metode, poput produljene fermentacije tijesta, kojima se sadržaj fitata može smanjiti (Banjari, 2012.).

## 2.4. PRINCIPI PRAVILNE PREHRANE

U svim životnim fazama, od začeca do starosti, potrebna je odgovarajuća količina i sastav hrane. Pravilna prehrana organizmu osigurava dovoljnu količinu i optimalan odnos proteina, ugljikohidrata, masti, vitamina, minerala i tekućine. Takvom prehranom podmiruju se potrebe organizma za energetskim, gradivnim i zaštitnim tvarima (Milosavljević, 2010.). Ne postoji namirnica koja bi sama mogla podmiriti potrebe ljudskog organizma. Čovjek mora kombinacijom različitih namirnica osigurati sastojke koji su neophodni za normalnu funkciju organizma (Mandić, 2007.). Nepravilna prehrana predstavlja čimbenik rizika za razvoj niza kroničnih nezaraznih bolesti (debljina, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, karcinom) i prehrambenih poremećaja, a pravilna prehrana povoljno djeluje u prevenciji kroničnih nezaraznih bolesti (Milosavljević, 2010.).

Žitarice u piramidi pravilne prehrane (**Slika 2**) čine temelj prehrane stoga je konzumacija žitarica vrlo važna jer predstavljaju glavni izvor energije u svakodnevnim obrocima. Također su izvor inhibitornih faktora, fitata, i predstavljaju izvor nehemskog željeza koji najviše utječe na unos sveukupnog željeza (Banjari i sur., 2013.).



**Slika 2** Piramida pravilne prehrane (Jošić, 2016.)



## 2.5. ŽITARICE I LEGUMINOZE

Skupina žitarica može se podijeliti na cjelovite žitarice i njihove proizvode te prerađene žitarice i njihove proizvode. Razlika između cjelovitih i prerađenih žitarica njihov je nutritivni sastav koji proizlazi iz načina obrade žitarica. Zrna cjelovitih žitarica se sastoje od ljuske, endosperma i klice, dok se kod prerađenih žitarica uklanjaju ljuska i klica, a ostaje samo endosperm. Nutrijenti cjelovitih žitarica raspoređeni su u ljusci, endospermu i klici. Zbog uklanjanja ljuske i klice tijekom prerade žitarica dolazi do smanjenja udjela određenih nutrijenata od 25 do 90 %, te se većina prerađenih žitarica ponovo obogaćuje izgubljenim nutrijentima (Marijanović-Vincetić, 2013.). Pšenica je kako u Hrvatskoj tako i u većini zemalja najzastupljenija žitarica, no danas se u pekarskoj industriji osim žitarica koriste i brojne leguminoze (Ugarčić-Hardi, 2007.). U nastavku su opisane vrste žitarica i leguminoza koje su bile obuhvaćene ovim istraživanjem.

### Heljda

Heljda se svrstava u žitarice zbog načina korištenja dok se po morfološkim i fiziološkim svojstvima bitno razlikuje od drugih žitarica. Sadrži vitamine B kompleksa kao što su niacin i riboflavin, a od minerala najviše sadrži fosfor i kalcij. Za razliku od drugih žitarica, proteini heljde i heljdinog brašna sadrže visoki udio esencijalne aminokiseline lizina. Sadrže manje glutaminske kiseline i prolina ali više arginina, asparaginske kiseline i triptofana nego drugi proteini žitarica. Škrob je glavni sastojak heljdinog zrna. Od fenolnih komponenti sadrže flavonoide, fenolnu kiselinu i tanine (Resiga, 2013.).

Heljdino brašno ne sadrži gluten i stoga je pogodno za osobe osjetljive na gluten. Tvari heljdinog brašna povoljno djeluju na kardiovaskularni sustav, sniženje krvnog tlaka i smanjenje rizika od pojave visokog kolesterola. Također nutrijenti u heljdinom brašnu pomažu u kontroli razine šećera u krvi i vrlo su korisni za dijabetičare (Resiga, 2013.).

### Pir

Proizvodi koji sadrže pir su probavljiviji i imaju nešto više proteina nego pšenica. Pir sadrži visok udio bjelancevina (više od 20 %), nezasićene masti, vitamine A, C, skupine B (niacin i

tiamin), mineralne soli (kalcij, kobalt, željezo, fosfor, magnezij, mangan, kalij, bakar, selen, natrij) te vlakna (Pušić, 2013.).

Cjelovito zrno pira sadrži bioaktivne i antioksidativne sastojke, uključujući hvatače slobodnih radikala, reducirajuće agense, fitokemikalije, tokoferole, tokotrienole i dr. i zato je posebno pogodan za osobe izložene stresu i za starije. Unatoč svemu, pir je vrsta pšenice, sadrži gluten, pa može izazvati glutensku enteropatiju (Pušić, 2013.).

Budući da je bogat vlaknima koristi se u dijetama za mršavljenje jer brzo daje osjećaj sitosti. Zbog visokog udjela ugljikohidrata, željeza i kalcija preporučuje se sportašima, anemičnim osobama i onima koji boluju od osteoporoze. Iako sadrži gluten, katkad ga podnose i osobe alergične na proizvode od obične pšenice (Pušić, 2013.).

Brašno pira se upotrebljava u proizvodnji smrznutog tijesta, pekarskih poluproizvoda i proizvoda radi povećanja nutritivne vrijednosti, veće antioksidacijske stabilnosti i manjeg sadržaja fitinske kiseline za razliku od obične pšenice. Kod proizvodnje specijalnih pekarskih proizvoda dodaje se kako bi se poboljšao okus i očuvala svježina proizvoda (Pušić, 2013.).

### Proso

Proso je žitarica koja se u Africi i Aziji oduvijek upotrebljava, dok se u razvijenim zemljama rijetko uzgaja. Osim što ne sadrži gluten, proso je alkalna žitarica i lako je probavljiva. Djeluje kao prebiotik, ne stimulira rast patogenih kvasaca kao što je *Candida*. Bogata je magnezijem i željezom, kalcijem, fosforom, cinkom, vitaminom E, vitaminima B kompleksa i odličan je izvor proteina. Može sadržavati znatne količine različitih fenolnih spojeva koji imaju pozitivan utjecaj na zdravlje čovjeka zbog antioksidativne aktivnosti koriste se kao nutraceutici i funkcionalna hrana (Pranjić, 2013.; Taylor i sur., 2006.).

### Raž

Raž je žitarica od koje se dobiva visokovrijedno raženo brašno koje sadrži visoki udio prehrambenih vlakana, proteina, mineralnih tvari i vitamina B skupine, a mali udio glutena. Prema stupnju uklanjanja posija ili čišćenja tijekom mljevenja, raženo brašno se dijeli na različite tipove. Što se više posija uklanja, brašno je svjetlije, ima manje bjelančevina i vlakana, te blaži okus (Resiga, 2013.). Prema Pravilniku o žitaricama, mlinskim i pekarskim proizvodima, tjestenini, tijestu i proizvodima od tijesta (NN 78/05.), raženi kruh se proizvodi iz više od 70 %

raženog brašna. Raženi kruhovi mogu imati različite oblike, boju, okus i aromu (Ugarčić-Hardi, 2007.). Kruh od raži odličan je dodatak prehrani dijabetičarima zbog aktiviranja brzog odgovora inzulinu. Kao izvrstan izvor topljivih vlakana, raž je korisna u smanjenju razine kolesterola, kontroli krvnog tlaka i očuvanju zdravlja srca. Raž sadrži lignane koji smanjuju rizik od pojave raka, a također djeluju kao fitoestrogeni i antioksidansi. Cjelovite žitarice, kao što je raž, su vrlo korisne za probavni sustav te liječenje pretilosti jer osiguravaju osjećaj sitosti duže vrijeme (Resiga, 2013.).

### **Zob**

Glavne komponente zobi čine škrob i topljiva vlakna.  $\beta$ -glukani i ostala prehrambena vlakna, visok udjel tokoferola i bioaktivnih fitokemikalija te nezasićene masne kiseline daju zobi vrijedna fiziološka i prehrambena svojstva stoga je povećana potražnja uključivanja zobi u prehranu ljudi.  $\beta$ -glukani pozitivno utječu na smanjene koncentracije kolesterola u serumu i postprandijalne razine glukoze. Aktivnost vitamina E proizlazi iz tokoferola i tokotrienola. Mnoge studije su utvrdile pozitivan učinak polinezasićenih i mononezasićenih masnih kiselina na ljudsko zdravlje. Prehrambena vlakna doprinose prevenciji bolesti srca, nekih oblika karcinoma te poboljšanje kratkotrajne i dugotrajne memorije (Sandhu i sur., 2015., Sternaa i sur., 2016.).

### **Slanutak**

Slanutak je jedna od najvažnijih leguminoza u svijetu budući da sadrži 50 % dostupnih ugljikohidrata, primarno u obliku škroba, te se smatra dobrim izvorom proteina. Zdravstvene organizacije u mnogim zemljama preporučuju konzumaciju leguminoza kao sredstva za redukciju rizika bolesti povezanih prehranom kao što su dijabetes neovisan o inzulinu, koronarna bolest srca i pretilost (Johnson i sur., 2005.).

Slanutak je namirnica niskog glikemijskog indeksa (GI) budući da se sporo probavlja zbog visokog sadržaja rezistentnog škroba. Inkorporacija slanutkovog brašna može sniziti GI bijelog kruha i osigurati pozitivan utjecaj na postprandijalne razine inzulina te zasitnost iako to autori nisu dokazali (Johnson i sur., 2005.).

### Soja

Soja spada u obitelj leguminoza. Prema svom kemijskom sastavu zrno soje je izuzetno dobar izvor proteina (više od 47 %) i ulja, zbog čega se koristi i kao uljarica i kao nadomjestak proteinima animalnog podrijetla. Sojino zrno sadrži oko 40 % dok sojino brašno sadrži najmanje 50 % proteina. Pored kalcija soja sadrži dosta fosfora, cinka i željeza. Sojino brašno sadrži antinutritivne komponente kao što je tripsin inhibitor te se zbog toga mora termički obraditi u tehnološkom procesu ili prilikom pripreme obroka (Kožul, 2011.). Dodatkom sojinog brašna dobije se kruh sa sadržajem proteina više od 14 % koji ima značajnu nutritivnu vrijednost (Ugarčić-Hardi, 2007.). Sojino brašno se pravi od prženog sojinog zrna. Postoje tri vrste sojinog brašna; prirodno ili punomasno koje sadrži ulje koje se nalazi u soji, odmašćeno iz kojeg se uklanja ulje i lecitirano kojemu se u preradi dodaje lecitin (Kožul, 2011.).

## 2.6. VALIDACIJA

Validacija je postupak kojim se laboratorijskim ispitivanjima utvrđuje odgovara li neka analitička metoda zahtjevima za određenu analitičku primjenu odnosno je li prikladna za rješavanje određenog analitičkog problema. Ovim se postupkom mogu utvrditi uzroci mogućih problema i pogrešaka. Validaciju metoda treba provoditi kod upotrebe nenormiranih metoda i metoda koje je razvio laboratorij, kada se normirane metode koriste izvan predviđenog područja primjene, kod proširenja i izmjene normirane metode te kada postoji sumnja u rezultat (Jakobek, 2016.; Flanjak, 2015.).

Parametri validacije metode su:

- Preciznost
  - ponovljivost
  - intermedijarna preciznost
  - obnovljivost
- Točnost
- Linearnost
- Specifičnost/selektivnost
- Područje
- Granica detekcije
- Granica kvantifikacije
- Robusnost

### Preciznost

Preciznost se može definirati kao stupanj slaganja između niza ponovljenih mjerenja izvedenih na istom homogenom uzorku pod propisanim uvjetima. Ovisno o uvjetima u kojima se određuje razlikujemo:

Ponovljivost – preciznost pod uvjetima ponovljivosti što uključuje isti laboratorij, istog analitičara, istu aparaturu te ponavljanje mjerenja u kratkom vremenskom razdoblju.

Intermedijarna preciznost (međupreciznost) – preciznost pod različitim uvjetima mjerenja unutar istog laboratorija u duljem razdoblju uz očekivane promjene nekih uvjeta (različiti analitičar, različiti instrumenti, reagensi različitih dobavljača).

Obnovljivost – preciznost pod uvjetima obnovljivosti. Uspoređuju se rezultati dobiveni istom metodom na identičnom uzorku u različitim laboratorijima s različitom opremom i analitičarima. Taj se parametar određuje u svrhu normiranja metode i rijetko je sastavni dio validacije koju provodi sam laboratorij (Lazarić, 2012.).

### Točnost

Definira se kao stupanj slaganja između stvarne vrijednosti i srednje vrijednosti rezultata mjerenja. Jedan od načina procjene točnosti metode je da se analit dodaje u uzorak te se određuje koncentracija analita u obogaćenom uzorku primjenom analitičke metode kojoj želimo odrediti točnost. Izmjerena koncentracija se uspoređuje s dodanom količinom analita i računa se iskorištenje prema **formuli 1**:

$$\text{Iskorištenje (\%)} = \frac{(X_{\text{obogaćeni uzorak}} - X_{\text{uzorak}})}{X_{\text{dodano}}} \cdot 100 \quad (1)$$

gdje je  $X$  količina analita (Lazarić, 2012.).

### Linearnost

Linearnost je mogućnost metode da unutar određenog područja koncentracije daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku (Jakobek, 2015.). Linearnost se određuje mjerenjem odziva metode na različite poznate koncentracije referentnog materijala. Preporučuje se najmanje pet koncentracija uz tri ponavljanja (Lazarić, 2012.).

Procjenjuje se matematički i grafički. Matematički se preko linearne regresije izrazi jednačina pravca ( $y = ax + b$ ) i izračuna koeficijent korelacije ( $k$ ). Nagib pravca ( $a$ ) parametar je koji ukazuje na osjetljivost metode dok odsječak pravca ( $b$ ) može ukazivati na sustavnu pogrešku. Za koeficijent korelacije uobičajeno se postavlja kriterij  $k \geq 0,99$ . Za vrlo niske koncentracije prihvaća se i kriterij  $k \geq 0,98$  (Lazarić, 2012.).

### **Specifičnost/selektivnost**

Sposobnost metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti nekih drugih komponenti u uzorku (Lazarić, 2012.).

Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan specifični analit. Selektivna metoda je ona kojom se može određivati više komponentata istovremeno pod uvjetom da te komponente ne smetaju jedna drugoj (Lazarić, 2012.).

### **Područje**

Područje koncentracije u kojem između koncentracije analita i mjernog signala postoji linearni odziv te se analit može kvantificirati uz odgovarajuću linearnost, točnost i preciznost. Proteže se od najniže koncentracije koju je moguće odrediti do koncentracije kod koje kalibracijska krivulja počinje odstupati od linearnosti (Lazarić, 2012.).

### **Granica detekcije i granica kvantifikacije**

Granica detekcije je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Procjena se izvodi iz omjera signal/šum, iz odsječka na y osi kalibracijskog pravca te mjerenjem slijepe probe. Omjer signal/šum može se primijeniti samo na analitičke postupke s baznom linijom, a prihvatljivi omjer za granicu detekcije je 3:1 odnosno 10:1 za granicu kvantifikacije (Lazarić, 2012.).

Granica kvantifikacije predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koja se još može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost (Lazarić, 2012.).

### **Robusnost**

Robusnost se definira kao mjera otpornosti analitičke metode na male, namjerne promjene radnih uvjeta metode (Lazarić, 2012.).





### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### 3.1. ZADATAK

Zadatak je bio validirati metodu za brzo spektrofotometrijsko određivanje željeza u brašnu te odrediti sadržaj željeza u sedam različitih vrsta brašna.

Nadalje, temeljem dobivenih rezultata, zadatak je bio utvrditi količinu željeza koja se unese konzumacijom kruha i pekarskih proizvoda na bazi brašna koja su analizirana, a uzimajući u obzir prosječnu, minimalnu i maksimalnu konzumaciju kruha i pekarskih proizvoda na razini Hrvatske i prema regijama.

#### 3.2. MATERIJAL I METODE

##### 3.2.1. Validacija spektrofotometrijske metode određivanja željeza

Za validaciju metode odabrani su parametri linearnost, preciznost i točnost.

##### Linearnost

Pripremljene su otopine standarda u slijedećim koncentracijama: 1  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$ , 7  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$  i 12  $\mu\text{g}$  Fe. Apsorbancija svake otopine očitana je 3 puta te je izračunata srednja vrijednost. Dobiveni su podaci iskorišteni za izradu standardne krivulje (**Slika 3**).

##### Preciznost

Ponovljivost pripreve otopina je određena tako što je pripremljeno 5 otopina istog uzorka i svaka izmjerena 3 puta. Srednja vrijednost i standardna devijacija izračunate su za ponovljivost pripreve otopina.

##### Točnost

Točnost metode izražena je kao iskorištenje (%) na način da su pripremljene 3 paralele otopine uzorka i svakoj su izmjerene apsorbance. Zatim su pripremljene još dvije otopine uzorka kojima su dodane otopine standarda poznate koncentracije od 2  $\mu\text{g}$  Fe i 7  $\mu\text{g}$  Fe te je svaka otopina izmjerena 3 puta.

#### 3.2.2. Spektroskofotometrijska metoda određivanja željeza

Analizirano je sedam različitih uzoraka brašna kupljenih u slobodnoj prodaji od različitih proizvođača. Analizirani uzorci su: heljdino, pirovo, proseno, raženo, slanutkovo, sojino i zobeno brašno.

Za određivanje željeza u uzorcima brašna korištena je spektroskofotometrijska metoda određivanja uzoraka koju su razvili Kosse i sur. (2001.).

##### Postupak

Uzorak od 1 g se važe u test-epruvete u koje se dodaje 10 cm<sup>3</sup> otopine za ekstrakciju željeza. Test-epruvete se zatvore i dobro promiješaju na Vortex miješalici te stavljaju u vodenu kupelj 15 min (od trenutka kada voda provrije). Nakon toga se hlade 15 min u posudi s hladnom vodom. Sadržaj se profiltrira u čistu test-epruvetu.

Od filtrata uzorka se uzima 1 cm<sup>3</sup> koji se izmiješa s 3 cm<sup>3</sup> kromogene otopine i ostavi stajati na sobnoj temperaturi 15 min te se izmjeri apsorbancija na 535 nm. Za svaki uzorak se rade dvije paralele.

Za svaki uzorak se mora napraviti slijepa proba, dodavanjem 3 cm<sup>3</sup> 3 M natrij acetata u 1 cm<sup>3</sup> filtrata uzorka.

##### Priprema standardne krivulje

Prvo je pripremljena štok otopina željeza za koju je korišteno elektrolitsko željezo uz dodavanje 1 % HCl u 1000 cm<sup>3</sup> kako bi se postigla konačna koncentracija željeza u otopini od 1000 µg Fe/cm<sup>3</sup>.

Standardne otopine željeza su pripremljene iz štok otopine željeza pomoću otopine za ekstrakciju željeza kako bi se postigle slijedeće koncentracije željeza: 1, 2, 5, 7, 10 i 12 µg/cm<sup>3</sup>. 1 cm<sup>3</sup> standardne otopine željeza se pomiješa s 3 cm<sup>3</sup> kromogene otopine i ostavi stajati na sobnoj temperaturi 15 min, a zatim se izmjeri apsorbancija na 535 nm. Na osnovi dobivenih vrijednosti dobije se standardna krivulja, a koncentracija željeza u ispitivanom uzorku očita se iz pravca linearne regresije.

#### Izračunavanje

Vrijednost apsorbancije za slijepu probu ( $A_{sp}$ ) se oduzme od vrijednosti apsorbancije za isti uzorak ( $A_{uz}$ ).

$$A = A_{uz} - A_{sp} \quad (2)$$

Dobivena apsorbancija za svaki uzorak se prenese na standardnu krivulju iz koje se zatim očitava koncentracija željeza (izražena u  $\mu\text{g Fe/cm}^3$ ) u analiziranom uzorku.

#### **3.2.3. Procjena potencijalnog unosa željeza iz kruha i pekarskih proizvoda na razini Hrvatske**

Ovaj dio istraživanja je proveden u suradnji s Hrvatskom agencijom za hranu (HAH).

Korišteni su podaci o prehrambenim navikama odrasle populacije Republike Hrvatske, odnosno izdvojeni su samo podaci o konzumaciji kruha i pekarske proizvode koji su objavljeni u nekoliko publikacija (Jurković i sur., 2015.; Jurković i sur., 2014.; Rečić, 2014.; Marjanović-Vincetić, 2013.). U istraživanju o prehrambenim navikama sudjelovalo je ukupno 1000 ispitanika s područja cijele Hrvatske koji su s obzirom na regiju iz koje dolaze podijeljeni na šest skupina: Zagreb i okolica, Sjeverna Hrvatska, Slavonija, Lika i Banovina, Istra, Primorje i Gorski Kotar, te Dalmacija. Sistem odabira ispitanika proveden je tako da oni predstavljaju nacionalno reprezentativni uzorak.

Sukladno smjernicama Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) (EFSA, 2009.) za potrebe procjene prehrambenih navika u ovom je istraživanju odabrana metoda 24-satnog prisjećanja. Kako bi se dobio bolji uvid u prehrambene navike, prikupljeni su podaci za tri dana, od kojih je jedan bio neradni, a preostala dva dana radna u razmaku od minimalno dva tjedna. Ovo ispitivanje provedeno je u ljeto 2011. godine, te predstavlja konzumaciju specifičnu za ljetni period. Podaci su prikupljeni intervjuom, a informacije su bilježene u prethodno pripremljen tiskani obrazac u koji je, uz informaciju o datumu i danu na koji se odnosi upitnik, bilježena i karakteristika prehrane (tipična/netipična).

Obrazac 24-satnog prisjećanja predviđa bilježenje informacija o vremenu konzumacije, vrsti namirnice, opisu namirnice, načinu pripreme, konzumiranoj količini i specifičnostima poput mjesta nabavke, proizvođača za gotove i polugotove proizvode i slično, u otvorenom upitniku.

Procjena prosječne dugoročne konzumacije, omogućena je prikupljanjem informacije o učestalosti konzumacije namirnice obuhvaćene 24-satnim prisjećanjem u svakodnevnoj prehrani. Tako je ispitanicima ponuđeno 11 nivoa učestalosti konzumacije (nekoliko puta dnevno, jednom dnevno, 4 do 5 puta tjedno, 2 do 3 puta tjedno, jednom tjedno, 2 do 3 puta mjesečno, jednom mjesečno, jednom u 2 do 3 mjeseca, jednom u pola godine, jednom godišnje, rjeđe) od kojih su trebali odabrati onaj koji najbolje opisuje njihovu konzumaciju navedene namirnice.

Za pomoć u procjeni veličine porcija korišten je atlas s fotografijama modela hrane (Senta i sur., 2004.), kao i dodatne informacije pomoću kojih se mogla indirektno izračunati količina konzumirane hrane.

#### **3.2.4. Obrada podataka**

Grafička i tablična obrada podataka napravljena je pomoću MS Office Excel tabličnog alata (inačica 2010, Microsoft Corp., USA).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. VALIDACIJA SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE ODREĐIVANJA ŽELJEZA

Provedena je validacija prema odabranim parametrima kako je navedeno u poglavlju 3.2.1.

**Tablica 2** Linearnost spektrofotometrijske metode za određivanje željeza

Linearnost	
Jednadžba regresijskog pravca	$A = 0,0719 + 0,0995 \cdot x$
Koeficijent korelacije	$r = 0,9997$
	$p = 0,00000$
	$r^2 = 0,9994$

Obzirom na nagib pravca i koeficijent korelacije koji je  $\geq 0,99$  (Lazarić, 2012.) može se zaključiti kako se za navedenu metodu može očekivati da unutar zadanog područja daje ispitne rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku.

Ponovljivost pripreme otopina prikazana je u **tablici 3** i jedan je od parametara preciznosti. Iz prikazanih je rezultata vidljivo kako izmjerena koncentracija željeza odstupa od srednje vrijednosti između 1,07 i 2,81 %. Ipak, dobra preciznost nije garancija točnosti metode. Točnost brze spektrofotometrijske metode prema Kosse i sur. (2001.) ispitana je na način da je u odabrani uzorak dodana poznata koncentracija referentnog materijala, koji je u ovom slučaju bila štok otopina željeza (opisano u poglavlju 3. 2. 2.).



**Tablica 3** Ponovljivost pripreme otopina spektrofotometrijske metode za određivanje željeza

Uzorak	Izmjerena apsorbancija	Izračunata koncentracija željeza	Srednja vrijednost koncentracije željeza	SD	Relativna SD (%)
<b>P1</b>	0,754	6,86	6,94	0,17	2,43
	0,750	6,82			
	0,781	7,13			
<b>P2</b>	0,816	7,48	7,53	0,08	1,07
	0,816	7,48			
	0,830	7,62			
<b>P3</b>	0,826	7,58	7,67	0,22	2,81
	0,820	7,52			
	0,860	7,92			
<b>P4</b>	0,687	6,18	6,08	0,10	1,64
	0,667	5,98			
	0,677	6,08			
<b>P5</b>	0,723	6,54	6,52	0,11	1,62
	0,710	6,41			
	0,731	6,62			

P – proseno brašno; SD – standardna devijacija

**Tablica 4** Točnost spektrofotometrijske metode za određivanje željeza

Uzorak	Izmjerena apsorbancija	Izračunata koncentracija željeza	Srednja vrijednost koncentracije željeza	SD	Iskorištenje (%)
<b>Z1</b>	0,414	3,44	3,59	0,13	
	0,440	3,70			
	0,432	3,62			
<b>Z2</b>	0,406	3,36	3,46	0,24	-6,50
	0,399	3,29			
	0,443	3,73			
<b>Z3</b>	0,414	3,44	3,44	0,07	-2,14
	0,427	3,57			
	0,422	3,52			

Z1 – zobeno brašno; Z2 – zobeno brašno uz dodatak 2 µg Fe;

Z3 – zobeno brašno uz dodatak 7 µg Fe; SD – standardna devijacija

Iskorištenje je izračunato prema **formuli (1)**. Iz **tablice 4** jasno je vidljivo kako prema vrijednostima apsorbancije kao ni izračunatih vrijednosti željeza nema razlike između uzoraka, odnosno rezultati ne pokazuju razlike između osnovnog uzorka Z1 i uzoraka Z2 i Z3 u koje je dodana poznata količina željeza. Kosse i sur. (2001.) su također dobili dobru preciznost metode za većinu analiziranih uzoraka, uključujući pšenično brašno obogaćeno s FeSO<sub>4</sub>, elektrolitično željezo, NaFeEDTA, Ferrochel® ili feljezov fumarat. Međutim, dobivene vrijednosti koncentracije željeza bile su značajno niže od onih dobivenih primjenom standardne metode i to za palentu i brašno obogaćeno željezom.

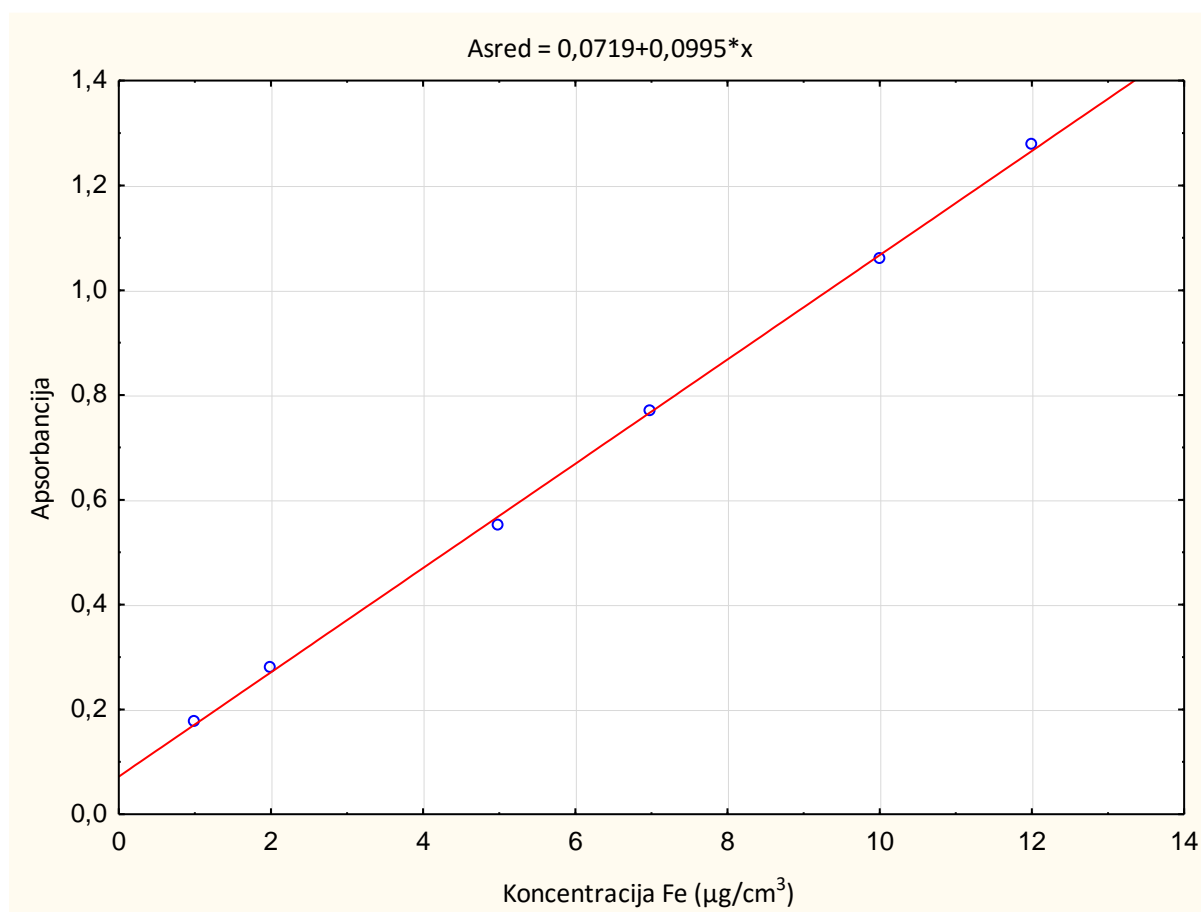
Na točnost utječu matrica (matriks) uzorka, postupak uzorkovanja i koncentracija analita koji se određuje (Lazarić, 2012.). Mogući razlozi ovakvog rezultata, odnosno potencijalni uzročnici interferencije su matriks uzorka, ali i sam nutritivni sastav uzorka.

Kod uzorka kao što je brašno treba imati u vidu visoku sposobnost adsorpcije vlage, uslijed koje može doći do pojave fizikalno neaktivne smjese kada je potrebno dodati veću količinu određenog reagensa kako bi se pokrenula reakcija (Trajković, 1983.). Analizirani uzorci (brašna od žitarica i leguminoza) sadrže značajne količine fitata koji keliraju metale koji postaju nedostupni za daljnje iskorištenje, što je još jedan od mogućih uzročnika dobivenih rezultata. Drugim riječima, količina prisutnih fitata i drugih inozitol-fosfata odgovorna je za inhibiciju apsorpcije željeza u organizmu čovjeka (Hurrell i sur., 2003.; Hallberg i Hultén, 2000.). Sadržaj fitinske kiseline, promatran i kao sadržaj fitinske kiseline u suhoj tvari i kao udio fosfora iz fitinske kiseline u ukupnom sadržaju fosfora zobi je niži nego u ječmu i pšenici ali viši nego u soji (Lolas i sur., 1976.). Istraživanje koje su proveli García-Estapa i sur. (1999.) je potvrdilo kako je sadržaj fitinske kiseline višestruko veći u pšeničnom brašnu cjelovitog zrna u usporedbi s bijelim pšeničnim brašnom (22,2 mg/g nasuprot 4,0 mg/g). Također, sadržaj fitinske kiseline u brašnima drugih žitarica se kreće u rasponu od 4,5 do 7,5 mg/g za raženo, rižino, ječmeno i zobeno brašno, dok je u kukuruznom, prosenom i sirkovom taj sadržaj oko 10 mg/g (García-Estapa i sur., 1999.). Također treba imati u vidu kako niska pH vrijednost pogoduje keliranju metala od strane fitata (Dendougui i Schwedt, 2004.), a upravo je dodatkom štok otopine željeza u uzorak zobenog brašna došlo do pada pH vrijednosti što je još jedan od mogućih razloga za dobivene rezultate.

Uzimajući u obzir dobivene rezultate za odabrane parametre validacije prikazane u **tablicama 2 do 4** može se zaključiti kako je za analizirane uzorke metoda za brzo spektrofotometrijsko određivanje željeza precizna ali netočna.

## 4.2. ODREĐIVANJE KOLIČINE ŽELJEZA

Mjerenjem apsorbancije standardnih otopina željeza u koncentracijama od 1, 2, 5, 7, 10 i 12  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  dobivena je standardna krivulja za određivanje željeza (**Slika 3**). Standardne otopine su pripremljene kako je opisano u eksperimentalnom dijelu.



**Slika 3** Standardna krivulja za određivanje željeza

Pomoću jednadžbe pravca

$$A = 0,0719 + 0,0995 * x \quad (3)$$

gdje  $x$  označava količinu željeza očitane iz standardne krivulje za odgovarajuću apsorbanciju pa se  $x$  računa prema **formuli (4)**:

$$x = \frac{A - 0,0719}{0,0995} \quad (4)$$

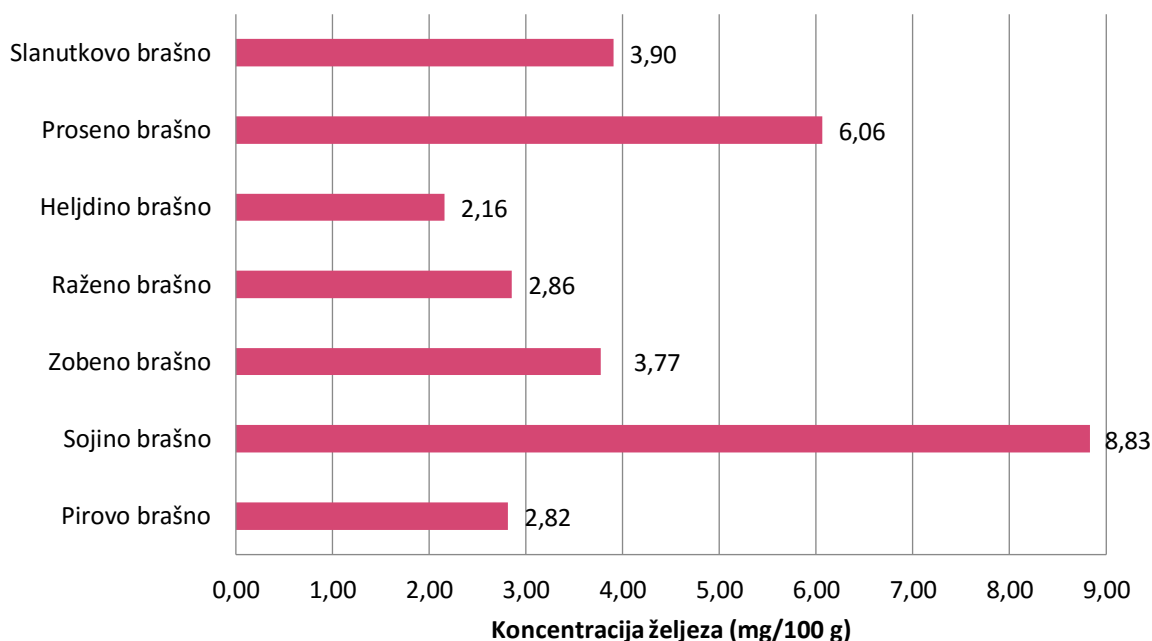
Nakon toga određuje se količina željeza u 100 g svakog ispitivanog uzorka prema **formuli (5)**:

$$mgFe/100\text{ g uzorka} = \frac{a * 100}{b} \quad (5)$$

gdje je

a – količina željeza izračunata prema **formuli (4)**

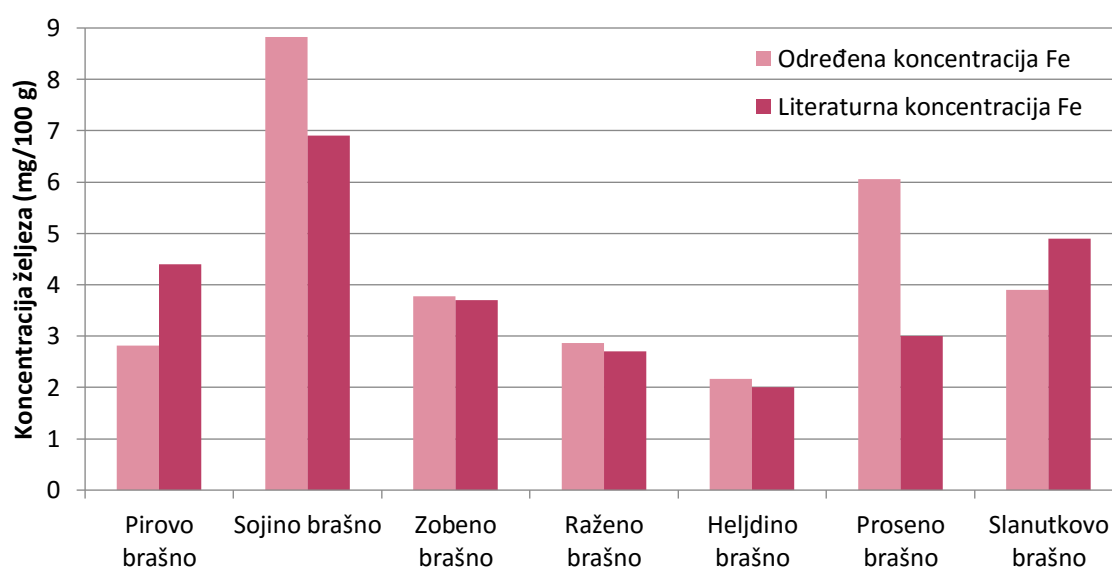
b – sadržaj početnog uzorka u alikvotnom dijelu uzetom u konačni postupak (g)



**Slika 4** Prosječne koncentracije željeza u analiziranim uzorcima brašna izražene u mg/100 g

Na **Slici 4** prikazane su prosječne koncentracije željeza analiziranih tipova brašna koje su izračunate prema **formuli (5)**. Najveću količinu željeza sadrži sojino brašno (8,83 mg Fe/100 g), dok najmanju količinu željeza ima heljdino brašno (2,16 mg Fe/100 g).

U usporedbi s rezultatima istraživanja koje je provela Glavaš (2009.) na 20 različitih tipova kruha i pekarskih proizvoda vidljivo je kako svi analizirani tipovi brašna imaju značajno više koncentracije željeza, a koje se djelomično mogu usporediti s koncentracijama željeza u graham tipu kruha i peciva (koncentracije željeza na 100 g graham proizvoda se kreću od 2,23 do 2,34 mg/100 g). Prema Pravilniku o žitaricama, mlinskim i pekarskim proizvodima, tjestenini, tijestu i proizvodima od tijesta (2005.) graham kruh spada u integralni pšenični kruh koji mora sadržavati više od 80 % pšeničnog brašna ili pšenične prekrupе od cijelog zrna. Nutritivno gledano, graham kruh ima veći sadržaj magnezija, željeza, cinka, selen i vitamina B skupine u odnosu na druge tipove kruha (Kaić-Rak i Antonić, 1990.) koji se češće konzumiraju, kao što su polubijeli ili bijeli kruh. Obzirom da su ovim istraživanjem provedene analize brašna, a ne pekarskih proizvoda, za detaljnije usporedbe dobiveni bi se podaci trebali usporediti s podacima za sadržaj željeza određenog istom metodom i za isti tip uzorka, odnosno brašna.



**Slika 5** Usporedba određene i literaturne koncentracije željeza u analiziranim uzorcima

Sadržaj željeza za zobeno, raženo i heljdino brašno odgovara vrijednostima koje se navode u literaturi, a vrijednosti za sojino brašno su nešto veće od onih navedenih u Tablici o sastavu namirnica i pića (Kaić-Rak i Antonić, 1990.). Vrijednosti za brašno slanutka (3,90 naprema 4,9) i pira (2,82 naprema 4,4) su manje od onih navedenih u literaturi (SND, 2016.) dok je vrijednost za proseno brašno dvostruko veća (6,06 naprema 3,0) (**Slika 5**).

### 4.3. PROCJENA POTENCIJALNOG UNOS ŽELJEZA IZ KRUHA I PEKARSKIH PROIZVODA

Kako je već spomenuto, kao jedan od mogućih pristupa borbi protiv anemije uslijed deficita željeza ističe se potencijal funkcionalnih proizvoda; obogaćivanje namirnica željezom i razvoj novih funkcionalnih proizvoda (Banjari, 2013.). Prilikom razvoja ovakvih proizvoda važno je odabrati jedan proizvod ili cijelu skupinu proizvoda koja je dostupna populaciji u riziku od razvoja anemije uslijed deficita željeza (Thompson, 2007.). Ipak, jednom kada se proizvod nađe na tržištu njegovu kupovinu nije moguće ograničiti. Uzimajući u obzir sve uloge željeza u organizmu treba imati u vidu i njegov toksičan učinak u stanjima suficita (Banjari, 2012.). Tu se posebice ističu njegov proooksidativni učinak (koji se povezuje s većim brojem infekcija), kao i njegov toksičan učinak na jetru kojemu su posebice izloženi muškarci (Banjari, 2012.). Upravo je ovo razlog brojnih polemika oko proizvoda koji se obogaćuju željezom. Prilikom plasiranja takvog i sličnih proizvoda na tržište radi se procjena rizika, odnosno izloženosti. Na razini Europske unije time se bavi EFSA koja pruža neovisne znanstvene savjete o postojećim i novim rizicima povezanim s hranom, a s ciljem zaštite potrošača od rizika u prehrambenom lancu (EFSA, 2016.).

Procjena rizika se odnosi na procjenu unosa za određenu populacijsku skupinu ili populaciju ukupno, tvari poput prehrambenih aditiva, ostataka pesticida, kemijskih kontaminanata, te nutrijentia, komponentama hrane (npr. masti) i drugih za koje se smatra kako imaju utjecaja na prehranu i/ili zdravlje. Procjena rizika sastoji se od četiri koraka. Nakon identifikacije i karakterizacije, u trećem koraku se procjenjuje izloženost kontaminantima ili unos hranjivih tvari, temeljem analitički dobivenih podataka o količini kontaminanta i/ili nutrijenata u hrani i procjeni količine unosa te hrane (EFSA, 2016.).

Procjena potencijalnog unosa željeza je napravljena obzirom na prosječnu, minimalnu i maksimalnu konzumaciju kruha i peciva za cijelu Republiku Hrvatsku i pojedinačno za svih šest regija (**Tablica 5**). U izračunu su korištene vrijednosti sadržaja željeza na 100 g proizvoda, a rezultati su izraženi za konzumente. Za procjenu unosa pretpostavljeno je da su kruh i peciva u potpunosti napravljeni od samo jednog od sedam analiziranih tipova brašna, prikazanih na **slici 4**. Prilikom procjene uzeto je u obzir kako je prosječan sadržaj (udio) vode u kruhu 40 %



(Kaić-Rak i Antonić, 1990.), te je procjena potencijalnog unosa željeza iz analiziranih vrsta brašna napravljena na udio suhe tvari.

Prema rezultatima iz HAH-a (Jurković i sur., 2015.; Jurković i sur., 2014.; Rečić, 2014.; Marjanović-Vincetić, 2013.) prosječna konzumacija kruha i peciva na razini RH iznosi 208,29 g. Konzumacija kruha i peciva najveća je u regiji Lika i Banovina (ukupno 266,19 g, 201,46 g kruha i 64,73 g peciva), zatim slijede Slavonija (ukupno 231,28 g), Istra, Primorje i Gorski Kotar (ukupno 211,64 g), Sjeverna Hrvatska (ukupno 185,22 g), Dalmacija (ukupno 183,93 g), te Grad Zagreb s najmanjom konzumacijom (ukupno 166,57 g). Procjena potencijalnog unosa željeza iz kruha i peciva prati ovaj trend i najviša je za proizvode od sojinog brašna (prosječan unos), a najmanja za heljdino brašno (prosječan unos) (**Tablica 5**).

Rezultati istraživanja koje je provela Glavaš (2009.) su pokazali kako brašna od drugih žitarica (osim pšeničnog) imaju veći sadržaj željeza (Glavaš, 2009.) te bi se pekarski proizvodi od ovih tipova brašna trebali promovirati kao funkcionalni proizvodi za sve populacijske skupine koje su u riziku od deficita željeza (Banjari, 2013.). Svakako treba imati u vidu i brojne tehnološke zahtjeve u pekarstvu uslijed kojih se neke vrste brašna, uključujući i neke od tipova brašna koji su analizirani u ovom radu ne mogu koristiti kao jedini tip brašna za izradu kruha i/ili drugih pekarskih proizvoda i uglavnom se koriste kao mješavine (Ugarčić-Hardi, 2007.).

Svakako treba imati u vidu visoki sadržaj fitinske kiseline u ovim tipovima brašna (Lolas i sur., 1976.; García-Esteba i sur., 1999.; Hurrell i sur., 2003.; Hallberg i Hultén, 2000.) čiji se negativan utjecaj na bioraspoloživost željeza može smanjiti dobrim kombiniranjem hrane, kao npr. pijenje soka od naranče (100 % juice) uz pecivo (Banjari, 2013.; Hurrell i sur., 2003.; Hallberg i Hultén, 2000.). Prema preporukama, maksimalni dnevni preporučeni unos se kreće od 40 do 45 mg/dan za oba spola (IOM, 2002.), a toliki je unos primjećen samo kod maksimalnih konzumacija kruha i peciva samo za slučaj proizvoda od sojinog brašna (koje se kao jednokomponentno ne koristi u pekarskoj industriji). Ako se uzme u obzir i bioraspoloživost željeza, može se zaključiti kako su analizirani tipovi brašna sigurni za konzumaciju te se preporučuju za izradu funkcionalnih proizvoda koji će imati visok sadržaj željeza.



**Tablica 5** Procjena unosa željeza iz kruha i peciva napravljenih od sedam analiziranih tipova brašna za Republiku Hrvatsku ukupno i šest regija

		Konzumenti (n)	Konsumacija kruha i peciva (g/dan)	Pirovo brašno (mg)	Sojino brašno (mg)	Zobeno brašno (mg)	Raženo brašno (mg)	Heljdino brašno (mg)	Proseno brašno (mg)	Slanutkovo brašno (mg)
RH ukupno	Kruh	497	125,91 (2,72 – 509,33)	2,13 (0,05 – 8,62)	6,67 (0,14 – 26,98)	2,85 (0,06 – 11,52)	2,16 (0,05 – 8,75)	1,63 (0,04 – 6,60)	4,58 (0,10 – 18,52)	2,95 (0,07 – 11,92)
	Peciva	65	82,38 (0,03 – 400,00)	1,39 (0,00 – 6,77)	4,36 (0,00 – 21,19)	1,87 (0,00 – 9,05)	1,42 (0,00 – 6,86)	1,07 (0,00 – 5,18)	2,99 (0,00 – 14,54)	1,93 (0,00 – 9,36)
Dalmacija	Kruh	187	135,79 (0,00 – 585,00)	2,30 (0,00 – 9,90)	7,19 (0,00 – 30,99)	3,07 (0,00 – 13,23)	2,33 (0,00 – 10,04)	1,76 (0,00 – 7,58)	4,94 (0,00 – 21,27)	3,18 (0,00 – 13,69)
	Peciva	46	48,14 (1,50 – 160,00)	0,82 (0,02 – 2,71)	2,55 (0,08 – 8,48)	1,09 (0,04 – 3,62)	0,83 (0,02 – 2,75)	0,62 (0,02 – 2,08)	1,75 (0,05 – 5,82)	1,13 (0,04 – 3,74)
Istra, Primorje i Gorski Kotar	Kruh	111	135,60 (11,20 – 692,80)	2,29 (0,19 – 11,72)	7,18 (0,59 – 36,70)	3,07 (0,25 – 15,67)	2,33 (0,19 – 11,89)	1,76 (0,14 – 8,98)	4,93 (0,41 – 25,19)	3,17 (0,26 – 16,21)
	Peciva	15	76,04 (4,80 – 385,00)	1,28 (0,08 – 6,52)	4,03 (0,25 – 20,39)	1,72 (0,11 – 8,71)	1,30 (0,08 – 6,61)	0,98 (0,06 – 4,99)	2,77 (0,17 – 13,99)	1,78 (0,11 – 9,01)
Lika i Banovina	Kruh	82	201,46 (0,00 – 646,67)	3,41 (0,00 – 10,94)	10,67 (0,00 – 34,26)	4,56 (0,00 – 14,63)	3,46 (0,00 – 11,10)	2,61 (0,00 – 8,38)	7,33 (0,00 – 23,51)	4,72 (0,00 – 15,13)
	Peciva	30	64,73 (4,80 – 256,00)	1,10 (0,08 – 4,33)	3,43 (0,25 – 13,56)	1,46 (0,11 – 5,79)	1,11 (0,08 – 4,39)	0,84 (0,06 – 3,32)	2,35 (0,17 – 9,31)	1,51 (0,11 – 5,99)

#### 4. Rezultati i rasprava

		Konzumenti (n)	Konsumacija kruha i peciva (g/dan)	Pirovo brašno (mg)	Sojino brašno (mg)	Zobeno brašno (mg)	Raženo brašno (mg)	Heljdino brašno (mg)	Proseno brašno (mg)	Slanutkovo brašno (mg)
Sjeverna Hrvatska	Kruh	171	128,23 (0,00 – 525,00)	2,17 (0,00 – 8,89)	6,79 (0,00 – 27,82)	2,90 (0,00 – 11,87)	2,20 (0,00 – 9,01)	1,66 (0,00 – 6,80)	4,66 (0,00 – 19,09)	3,00 (0,00 – 12,29)
	Peciva	51	56,99 (11,20 – 188,80)	0,97 (0,19 – 3,19)	3,02 (0,59 – 10,00)	1,29 (0,25 – 4,27)	0,98 (0,19 – 3,24)	0,74 (0,14 – 2,45)	2,07 (0,41 – 6,86)	1,33 (0,26 – 4,42)
Slavonija	Kruh	172	163,68 (1,12 – 850,00)	2,77 (0,02 – 14,38)	8,67 (0,06 – 45,04)	3,70 (0,02 – 19,23)	2,81 (0,02 – 14,59)	2,12 (0,02 – 11,02)	5,95 (0,04 – 30,91)	3,83 (0,02 – 19,89)
	Peciva	36	67,60 (4,80 – 184,00)	1,15 (0,08 – 3,11)	3,58 (0,25 – 9,75)	1,53 (0,11 – 4,16)	1,16 (0,08 – 3,16)	0,90 (0,06 – 2,38)	2,46 (0,17 – 6,69)	1,58 (0,11 – 4,31)
Zagreb	Kruh	244	105,56 (0,00 – 650,00)	1,79 (0,00 – 11,00)	5,59 (0,00 – 34,44)	2,39 (0,00 – 14,71)	1,81 (0,00 – 11,15)	1,69 (0,00 – 8,42)	3,84 (0,00 – 23,63)	2,47 (0,00 – 15,21)
	Peciva	96	61,01 (2,40 – 220,00)	1,03 (0,04 – 3,72)	3,23 (0,13 – 11,66)	1,38 (0,05 – 4,97)	1,04 (0,04 – 3,77)	0,79 (0,03 – 2,85)	2,22 (0,09 – 7,99)	1,43 (0,05 – 5,15)

RH – Republika Hrvatska

Vrijednosti su prikazane kao prosječan unos (minimalni – maksimalni).

## **5. ZAKLJUČCI**

Na osnovi rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- metoda pokazuje dobru linearnost ( $r = 0,9997$ ), dobru ponovljivost pripreme otopina (relativna standardna devijacija se kreće od 1,07 do 2,81 %), ali nezadovoljavajuću točnost;
- uzimajući u obzir dobivene rezultate za odabrane parametre validacije može se zaključiti kako je za analizirane uzorke metoda za brzo spektrofotometrijsko određivanje željeza precizna ali netočna;
- najveći sadržaj željeza određen je u sojinom brašnu (8,83 mg Fe/100 g), a najmanji u heljdinom brašnu (2,16 mg Fe/100 g);
- obzirom na literaturno dostupne podatke, sadržaj željeza određen u sojinom brašnu je nešto veći, u prosenom brašnu je dvostruko veći, dok su za slanutkovo i pirovo brašno manje;
- obzirom na prosječnu konzumaciju kruha i peciva na razini Hrvatske i pojedinim regijama, najveći procijenjeni potencijalni unos željeza može se ostvariti u regiji Lika i Banovina, a slijede Slavonija, Istra, Primorje i Gorski Kotar, Sjeverna Hrvatska, Dalmacija, te Grad Zagreb;
- uz pretpostavku da je proizveden od jedne vrste brašna prema istoj recepturi najviši procijenjeni unos željeza postigao bi se konzumacijom kruha i peciva od sojinog brašna, a najniži za proizvode od heljdinog brašna.

Analizirani tipovi brašna se obzirom na sadržaj željeza mogu smatrati funkcionalnima. Stoga bi se trebali promovirati kako u pekarskoj i srdonim industrijama tako i među osobama u riziku od nedovoljnog unosa željeza prehranom. Uzimajući u obzir čimbenike koji utječu na bioraspoloživost željeza iz prehrane kao i procijenjeni unos željeza iz kruha i peciva na bazi nekog od analiziranih tipova brašna oni se mogu smatrati sigurnima za konzumaciju. Kako bi se postigao željeni učinak ovakvih proizvoda na prevenciju deficita željeza potrebno je educirati potrošače o pravilnom kombiniranju hrane, čime se može povećati bioraspoloživost željeza iz hrane koji je i danas najčešći nutritivni deficit u svijetu.

## **6. LITERATURA**

- Banjari I: Unos željeza prehranom kao mjera prevencije anemije u trudnoći. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* 2(2):71-77, 2013.
- Banjari I: Prehrambeni unos i status željeza, te incidencija anemije u trudnica. *Doktorski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2012.
- Banjari I, Kenjeric D, Mandić ML: What is the real public health significance of iron and iron deficiency anaemia in Croatia? A population-based observational study on pregnant women at early pregnancy from eastern Croatia. *Central European Journal of Public Health* 23(2):122–127, 2015.
- Banjari I, Kenjeric D, Mandić ML: Iron bioavailability in daily meals of pregnant women. *Journal of Food and Nutrition Research* 52(4):203–209, 2013.
- Dendougui F, Schwedt G: In vitro analysis of binding capacities of calcium to phytic acid in different food samples. *European Food Research and Technology* 219(4):409-415, 2004.
- EFSA, European Food Safety Agency: The EFSA Comprehensive European Food Consumption Database. <https://www.efsa.europa.eu/en/food-consumption/comprehensive-database> [01.09.2016.]
- EFSA, European Food Safety Authority: *General principles for the collection of national food consumption data in the view of a pan-European dietary survey*. EFSA Journal 7(12):1435, 2009.
- Flanjak I: *Upravljanje kakvoćom u laboratoriju (ppt predavanja)*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.
- [http://studenti.ptfos.hr/Diplomski\\_studij/Upravljanje\\_kakvocom\\_u\\_laboratoriju/UKL\\_7\\_Validacija%20i%20mjerna%20nesigurnost.pdf](http://studenti.ptfos.hr/Diplomski_studij/Upravljanje_kakvocom_u_laboratoriju/UKL_7_Validacija%20i%20mjerna%20nesigurnost.pdf) [29.04.2016.]
- García-Esteba RM, Guerra-Hernández E, García-Villanova B: Phytic acid content in milled cereal products and breads. *Food Research International* 32:217-221, 1999.



---

Glavaš A: Pekarski proizvodi kao izvor željeza u prehrani. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2009.

Hallberg L, Hulthén L: Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. *American Journal of Clinical Nutrition* 71:1147–1160, 2000.

Hurrell RF, Reddy MB, Juillerat M-A, Cook JD: Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 77:1213-1219, 2003.

IOM, Institute of Medicine, Food and Nutrition Board: *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids*. National Academy Press, Washington DC, 2002.

Jakobek L: *Instrumentalne metode II (pdf predavanja)*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2016.

[http://studenti.ptfos.hr/Diplomski\\_studij/Instrumentalne\\_metode\\_II/1%20dio%20predavanja/1,2%20-%20validacija,%20kalibracija.pdf](http://studenti.ptfos.hr/Diplomski_studij/Instrumentalne_metode_II/1%20dio%20predavanja/1,2%20-%20validacija,%20kalibracija.pdf) [29.04.2016.]

Jurković M, Sokolić D, Kenjerić D: Contribution of bakery products to salt intake in Croatia. U Book of abstracts of 8th International Congress Flour-Bread '15 and 10th Croatian Congress of cereal Technologists Brašno-Kruh '15, str. 5, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.

Jurković M, Marijanović-Vincetić D, Jurković Z, Mandić ML, Sokolić-Mihalak D: Salt intake through bakery products in Slavonia Region. U Proceedings of 7th International Congress Flour-Bread '13 and 9th Croatian Congress of Cereal Technologists, str. 42-49, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.

Johnson SK, Thomas SJ, Hall RS: Palatability and glucose, insulin and satiety respo of chickpea flour and extruded chickpea flour bread eaten as part of a breakfast. *European Journal of Clinical Nutrition* 59, 169–176, 2005.

- Jošić M: Piramida pravilne prehrane nekad i danas, 2016. Slika: Piramida pravilne prehrane <http://www.plivamed.net/aktualno/clanak/5348/Piramida-pravilne-prehrane-nekad-i-danas.html> [18.05.2016.]
- Kaić-Rak A, Antonić K: *Tablice o sastavu namirnica i pića*. Zavod za zaštitu zdravlja SR Hrvatske, Zagreb, 1990.
- Kosse JS, Yeung AC, Gil AI, Miller DD: A rapid method for iron determination in fortified foods. *Food Chemistry* 75, 371-376, 2001.
- Kožul Ž: Prehrambeni proizvodi od soje. *Završni rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011.
- Lazarić K: Validacija analitičkih metoda – osnovna načela. *Svijet po mjeri*. ISSN 1848-7114. - 1; str. 61-64, 2012.
- Lolas GM, Palamidis N, Markakis P: The phytic acid-total phosphorus relationship in barley, oats, soybeans, and wheat. *Cereal Chemistry* 53(6):867-871, 1976.
- Mandić ML: *Znanost o prehrani: hrana i prehrana u čuvanju zdravlja*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.  
[http://studenti.ptfos.hr/Preddiplomski\\_studij/Znanost\\_o\\_prehrani/MandicML\\_Znanost\\_o\\_prehrani.pdf](http://studenti.ptfos.hr/Preddiplomski_studij/Znanost_o_prehrani/MandicML_Znanost_o_prehrani.pdf) [06.06.2016.]
- Marijanović-Vincetić D: Konzumacija pekarskih proizvoda i procjena unosa soli odrasle populacije s područja Slavonije. *Specijalistički rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.
- Milosavljević D: Ispitivanje znanja o prehrani i prehrambenih navika srednjoškolske populacije. *Specijalistički rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010.
- Narodne novine: Pravilnik o žitaricama, mlinskim i pekarskim proizvodima, tjestenini, tijestu i proizvodima od tijesta, 2005. <http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/289068.html> [14.06.2016.]

Pušić M: Utjecaj dodatka pira na svojstva ekstrudiranih proizvoda na bazi kukuruzne krupice.

*Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.

Pranjić I: Proso - bezglutenska, visokovrijedna i lako probavljiva žitarica, 2013.

<https://www.fitness.com.hr/prehrana/nutricionizam/Proso.aspx> [18.05.2016.]

Rečić M: Usporedba konzumacije pekarskih proizvoda odrasle populacije Dalmacije i Like.

*Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.

Resiga N: Antioksidativna aktivnost odabranih vrsta brašna. *Završni rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.

Sandhu KS, Godara P, Kaur M, Punia S: Effect of toasting on physical, functional and antioxidant properties of flour from oat (*Avena sativa* L.) cultivars. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 2015.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2015.06.004>

SND, Self Nutrition Data: Nutrition Facts and Calories. <http://nutritiondata.self.com/>

[29.04.2016.]

Senta A, Pucarín-Cvetković J, Doko Jelinić J: Kvantitativni modeli namirnica i obroka.

Medicinska naklada, Zagreb, 2004.

Sternaa V, Zuteb S, Brunava L: Oat grain composition and its nutrition benefice. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 8, 252 – 256, 2016.

Taylor JRN, Schober TJ, Bean SR: Novel food and non-food uses for sorghum and millets.

*Journal of Cereal Science* 44, 252–271, 2006.

Thompson B: Food-based approaches for combating iron deficiency. U *Nutritional Anemia*, str. 337-358, Sight and Life Press, Basel, 2007.

Trajković J: Analize životnih namirnica. Univerzitet u Beogradu, Tehnološko metalurški fakultet, Beograd, 1983.

Ugarčić-Hardi Ž: *Tehnologija proizvodnje i prerade brašna: Pekarstvo*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

Whitney E, Rolfes SR: *Understanding Nutrition*. Cengage Learning, Wadsworth, 2011.

WHO, World Health Organization: *Iron Deficiency Anaemia: assessment, prevention and control*, 2001.

[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66914/1/WHO\\_NHD\\_01.3.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66914/1/WHO_NHD_01.3.pdf)

[10.05.2016.]

WHO, World Health Organization, 2016. <http://www.who.int/topics/anaemia/en/>

[02.05.2016.]